

実験的局所脳静脈梗塞の研究

— 家兎を用いたモデルの作製と脳静脈梗塞の病態についての研究 —

藤 重 正 人

札幌医科大学脳神経外科学講座 (主任 端 和夫 教授)

An Experimental Local Cerebral Venous Infarction, — Creation of an Experimental Model and Pathophysiological Study in the Rabbit.

Masahito FUJISHIGE

Department of Neurosurgery, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. K. HASHI)

ABSTRACT The histological change in cerebral venous infarction is characterized by marked brain edema with scattered parenchymal hemorrhages, often conglomerating into a hematoma with mass effect creating problems in neurosurgical operations where the major cerebral venous channel may sometimes have to be sacrificed. However, there have been few pathophysiological studies and the specific character of this condition remains uninvestigated, mainly due to the difficulty of obtaining suitable experimental models.

In this report an experimental production of a regional venous infarction was attempted in the rabbit by obstructing the cortical vein over the cortex opticus using electrocautery via craniotomy. The venous drainage from the cortex opticus consists of one or two large veins. Obstruction of these veins along the whole length by electrocautery resulted in hemorrhagic infarction within 24 hours in approximately 70% of the animals. The lesion was a wedge-shaped or semicircular-shaped area of infarction consisting of poor staining, vacuolation and ischemic cell changes. There was marked edema in the white matter and many foci of perivascular hemorrhages were widely distributed beyond the border of the infarcted territory.

Electron microscopic observation showed enlargement of the spaces around the capillaries with leakage of the erythrocytes, although the tight junction of the endothelium and the number of cytoplasmic vesicles were unchanged. Rupture of the vessel wall was observed in the capillary.

The rCBF was measured using a Laser-Doppler flowmeter on the surface of the cortex opticus and showed a decrease within 30 minutes after venous obstruction reaching the value of approximately 80% in 3 hours.

The effect of systemic arterial hypertension was studied with animals made hypertensive by the injection of metaraminol. Leakage of injected Evans blue and the incidence and degree of hemorrhage in the area of venous infarction were augmented by the presence of systemic hypertension.

(Received December 21, 1989 and accepted January 12, 1990)

Key words: Cerebral venous infarction, Cerebral hemorrhage, Cerebral blood flow, Experimental cerebral infarction

1 結 言

脳静脈梗塞は脳神経外科領域の臨床において、術中の静脈の切断や脳圧排により起こる術後合併症として少なからず発生する。しかし、脳静脈梗塞に関する基礎的研究は適当な実験モデルがないことにより、ほとんど行なわれておらず、その病態についての知見が乏しい。

過去における脳静脈梗塞の実験モデルとしては、いくつかのものが報告されているが¹⁻¹²⁾、脳静脈梗塞の磁気共鳴画像 (MRI) を検討した一方法¹³⁾を除いて、すべてが脳全体の静脈圧を亢進させる実験モデルで、局所脳静脈梗塞の病態を観察するには不適切な方法である。

本研究では、局所脳静脈梗塞を起こす動物実験モデルを作製し、病理組織学的観察と脳血流量測定を行なった。

2 実験方法

2.1 実験動物

体重 3.0~4.0 kg の家兎 (日本白色種) 計 69 羽を用いた。

2.2 麻酔および生理的パラメータの調節と測定

2.3.1 を除く実験動物に対して下記のごとき麻酔および処置を行なった。すなわち、ケタミン (ケタラル® 500 mg/10 ml) 1 ml/kg、キシラジン (セラクター® 500 mg/25 ml) 0.5 ml/kg の混合液を筋注し鎮静した後、気管切開を行ない、3-0 気管チューブを挿入した。耳静脈より d-ツボクラリンクロライド (Sigma Chemical Company) 15 mg/100 ml 生食を注入ポンプ (IVAC 580) を用いて 5 ml/kg/hr の速度で投与して実験動物を不動化し、人工呼吸器 (HARVARD, Model 607) を用いて調節呼吸とした。麻酔は、酸素 30%、笑気 70% の混合ガスで維持した。耳中心動脈に、22 G ポリエチレンカテーテルを挿入し、その一端をトランスデューサー (GOULD, Disposable Transducer System) に接続し、動脈圧を連続記録した。適宜動脈血ガス分析を行ない、動脈血二酸化炭素分圧 (PaCO_2) を 35~40 mmHg、酸素分圧 (PaO_2) を 80~120 mmHg に維持した。

2.3 局所脳静脈梗塞モデルの作製

2.3.1 Cortex opticus を還流する皮質静脈の閉塞

2.2 と同様にケタミン、キシラジンにより鎮静した後、実験動物用頭部固定装置 (David Kopf Instruments, Type 1204) を用い、手術用顕微鏡下に眼裂より耳介に

向かって約 4 cm の皮切を加えた。前頭筋・側頭筋を切開翻転し、ダイヤモンドバーを装着したエアドリルを用いて側頭窩の骨を削除すると硬膜下に cortex opticus を還流する 1~2 本の皮質静脈が確認できる。静脈の走行に沿って硬膜を切開し、皮質静脈が ventrolateral vein に流入する部分を 2~3 mm にわたって、生理的食塩水を滴下しながら先端 0.3 mm の双極電気凝固摂子、および双極電気凝固止血器 (AESCULAP, GK 51) を用いて出力約 4 watt で熱凝固した (以下この処置を「静脈閉塞」とする)。硬膜は開放したままとし、骨欠損部を骨蠟を用いて閉鎖し、筋と皮膚をそれぞれ縫合閉鎖した。セファピリンナトリウム 50 mg/kg を筋注し、麻酔から覚醒させた後、術前と同様に飼育室で保育した。静脈閉塞後 24 時間、あるいは 72 時間を経過して再度ケタミン、キシラジンにより麻酔し、脳を灌流固定した。

2.3.2 熱凝固による脳損傷の検討

対照群として、2.3.1 と同様に骨を削除し、硬膜を切開した後、脳表面の無血管野を幅約 2 mm にわたって熱凝固した (以下この処置を「皮質凝固」とする)。2.3.1 と同様にして創を閉鎖し、麻酔から覚醒させ、飼育室で保育した。皮質凝固後 72 時間を経過して脳を灌流固定した。

2.4 脳静脈閉塞時の脳循環の測定

局所皮質脳血流量 (rCBF) は、レーザー組織血流計 (ADVANCE, ALF 2100) を用いて測定した。2.3.1 と同様にして開頭し、血流測定用のニードル型プローブ (直径 1 mm) を皮質静脈が ventrolateral vein に注ぐ部分より 5 mm 以上離れた cortex opticus の硬膜上に設置した。処置前の値を測定した後、2.3.1 に記したように皮質静脈が ventrolateral vein に注ぐ部分を熱凝固し、その後 3 時間 rCBF を測定した。局所脳血液量 (rCBV) は、rCBF と同時に測定された。rCBV と rCBF の変化は動脈圧と共にポリグラフに連続的に記録した。静脈閉塞後 3 時間を経過して脳を灌流固定した。

rCBF は ml/100 g/min として、rCBV はレーザー組織血流計独自の単位 (volume) で表示された。Cortex opticus で測定した rCBF, rCBV, rCBF/rCBV の経時的推移を、静脈閉塞前または皮質凝固前の値を 100% とする割合で表わし、各群間で比較した。

対照群は 2.3.2 に記した処置を行ない、凝固部より 5 mm 以上離れた cortex opticus の硬膜上にプローブを設置し、上記と同様にして、rCBF, rCBV を測定した。皮質凝固後 3 時間を経過して脳を灌流固定した。

2・5 局所脳静脈梗塞部の全身血圧上昇による影響

静脈閉塞に先立って、メタラミノールをマイクロインジェクター (HARVARD, Infusion-Withdrawal Pump 940) を用い、0.034 mg/kg/min の用量で経静脈的に注入することにより全身血圧を25~30%上昇させた。血圧上昇させた10分後に2・3・1の方法により皮質静脈を閉塞し、その10分後に灌流固定した。これらの動物における組織所見は、血圧を上昇させなかったものと比較した。

2・6 電子顕微鏡による病理組織学的検討

2・6・1 ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 投与方法

2・3・1の方法により皮質静脈を閉塞し、その35分後に塩酸プロメタジン2 mg/kgを静注し、静脈閉塞45分後にHRP (Type 2, Sigma Chemical Company) 50 mg/kgを生理的食塩水1 mlに溶解したものを1~2分間で静注した。静脈閉塞後1時間を経過して脳を灌流固定した。

2・6・2 ジアミノベンジデン (DAB) 反応

閉塞した静脈の還流域を、4 mm立方のブロックとしてビプラトーム (OXFORD) で厚さ50 μ mの切片とした。0.1 M カコジル酸バッファー液で洗浄し、0.05 M トリスバッファー液100 mlに3, 3'-DAB (Sigma Chemical Company) 50 mgを加え20分間浸漬し、1%過酸化水素水1 mlを加えさらに20分間浸漬した。再び0.1 M カコジル酸バッファー液で十分に洗浄し、発色した部分を1 mm平方にトリミングした。1%オスミウム酸で後固定した後洗浄し、常法によりアルコールで脱水し、エポンに包埋した。切片は約0.1 μ mに薄切し、未染色、鉛単染色ならびに鉛・酢酸ウラニル二重染色後、電子顕微鏡 (JEOL 100 C) で観察した。

2・7 固定法

すべての実験動物で、調節呼吸下に左心室より上行大動脈に挿入したカテーテルを介し90 cmの高さから生理的食塩水100 mlを30分間で点滴注入すると同時に、下行大動脈を胸部で閉塞し、さらに右心耳を切開して脱血させ、脳を脱血灌流した。2・3, 2・4, 2・5で使った実験動物は、続いて10%中性緩衝ホルマリン液またはブアン液100 mlで30分間灌流固定した後直ちに脳を摘出し、灌流固定に用いた固定液で浸潤固定した。

2・6で使った実験動物は、0.1 M カコジル酸バッファー液で5倍希釈したカルノフスキー液100 mlにより30分間灌流固定した後、直ちに脳を凝固した部分より4 mm間隔で冠状断し、カルノフスキー原液¹⁴⁾で浸潤

固定した。

2・8 エヴァンスブルー (EB) 漏出面積の測定

2・3, 2・5で使った実験動物について、灌流固定30分前に2% EB 2 mlを耳静脈より注入した。

固定後、脳表面のEBが漏出した部分の短径、長径をノギスで測定し、実測値に基づいて、方眼紙上にEB漏出の形態を模倣した。その図形をスキャナを用いてコンピューターに取り込み、EBの漏出面積を求めた。

2・9 病理組織標本の作製

2・3, 2・5で使った実験動物について、固定後、脳を厚さ4 mmの冠状断とし、肉眼的に観察した。エタノールにより脱水後、パラフィン包埋し、厚さ5 μ mの切片を作製して、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

2・10 統計学的処理

得られた測定値は、平均値 \pm 標準誤差で表示した。各群のデータは、正規性の疑わしいものはMann-Whitney U test 又はKruskal-Wallis testを用い、その他については、Studentのt-testを用いた。

3 成績

3・1 Cortex opticus を還流する皮質静脈の閉塞

静脈閉塞処置後24時間のもの10羽、72時間のもの10羽、対照群9羽、計29羽を使用した。

3・1・1 肉眼的所見

全体の実験成績は、Table 1にまとめて示されている。この中、静脈閉塞例ではFig. 1aにみられるように閉塞後24時間の10羽中2羽と、72時間の10羽中5羽に脳表面に出血が認められた。対照群では脳表面に出血を認めた例はなかった。一方、静脈閉塞例で脳表面に出血を認めなかった全例に、Fig. 1bにみられるようにEBの漏出による脳表面の青染が観察され、6羽では静脈閉塞部周囲にわずかに、7羽では閉塞した静脈の還流域に広範囲にそれぞれ認められた。

対照群では脳表面に変化を認めなかったもの1羽、皮質凝固部周囲にEBの漏出をわずかに認めたもの6羽、皮質凝固部と離れた部分にEBの漏出を認めたもの2羽であった。

静脈閉塞例を、閉塞部より1 mm鼻側を通る冠状断面で観察すると、脳表面に出血を認めたもの7羽中5羽で、Fig. 1cのように白質にまで及ぶ楔形の血腫が認められた。また、その他の2羽と広範囲にEBの漏出を認めたもの全羽で、Fig. 1dのように楔形または半円形のEBの漏出と皮質下の点状出血が認められた。EBの漏出をわずかに認めたもの6羽中4羽でも同様なEBの漏

Table 1 *Histopathological data of the animal with obstruction of the cortical vein in the cortex opticus.*

Group	case No.	view of brain surface	view of coronal section	hemorrhage beyond the border of the ischemic area	edema in the white matter	calculated area of EB leakage (mm ²)
24 hours after O. V.	1	large EB leakage	EB leakage and P. H.	present	present	117.1
	2	hemorrhage	hematoma	present	present	51.3
	3	small EB leakage	EB leakage and P. H.	present	present	9.2
	4	small EB leakage	EB leakage and P. H.	none	none	3.6
	5	large EB leakage	EB leakage and P. H.	none	none	27.9
	6	small EB leakage	EB leakage and P. H.	present	present	7.6
	7	hemorrhage	hematoma	present	present	32.1
	8	large EB leakage	EB leakage and P. H.	none	present	17.5
	9	large EB leakage	EB leakage and P. H.	present	present	24.3
	10	large EB leakage	EB leakage and P. H.	present	present	17.5
Total		hemorrhage (2) large EB leakage (5) small EB leakage (3)	hematoma (2) EB leakage and P. H. (8)	present (7) none (3)	present (8) none (2)	mean 30.7±10.6*
72 hours after O. V.	11	small EB leakage	none (microscopic hemorrhage)	none	none	5.0
	12	small EB leakage	EB leakage and P. H.	present	present	5.7
	13	small EB leakage	none	none	none	3.0
	14	hemorrhage	EB leakage and P. H.	present	present	28.1
	15	hemorrhage	hematoma	none	present	32.3
	16	hemorrhage	hematoma	none	present	63.9
	17	large EB leakage	EB leakage and P. H.	present	present	21.0
	18	hemorrhage	EB leakage and P. H.	none	present	15.3
	19	hemorrhage	hematoma	present	present	41.7
	20	large EB leakage	EB leakage and P. H.	none	present	14.7
Total		hemorrhage (5) large EB leakage (2) small EB leakage (3)	hematoma (3) EB leakage and P. H. (5) none (2)	present (4) none (6)	present (8) none (2)	mean 23.1±6.0*
Control (n=9)		small EB leakage (8) none (1)	EB leakage and P. H. (2) EB leakage (2) none (5)	none (9)	present (1) none (8)	mean 3.5±0.7

O. V.: obstruction of the cortical vein P. H.: petechial hemorrhage (): the number of animals *: p<0.01 vs control

出と皮質下の点状出血が見られたが、他の2羽では変化は認められなかった。

対照群では、皮質凝固部から1mm鼻側あるいは凝固部を通る冠状断を行ない観察したが、皮質凝固部周囲にEBの漏出を認めた6羽中2羽で、半円形のEBの漏出が見られ、凝固部より離れた部分にEBの漏出を認めた2羽では、半円形のEBの漏出と皮質下の点状出血を呈していた。

3・1・2 EB 漏出面積

EBの漏出面積を比較すると、Table 1に示されてい

るように静脈閉塞後24時間の群で30.7±10.6 mm²、72時間の群で23.1±6.0 mm²であり、有意差はなかったが、両者とも対照群の3.5±0.7 mm²に比べると、有意に大であった(p<0.01)。漏出面積が10 mm²以上となったものはすべて、閉塞した静脈の還流域にEBの漏出が認められ、静脈閉塞後24時間の群で7羽、72時間の群で7羽に見られたが、対照群には見られなかった。

3・1・3 病理組織学的所見

静脈閉塞例で肉眼的に出血を認めた7羽中5羽でFig. 2aにみられるように、白質に及ぶ血腫と血腫周囲

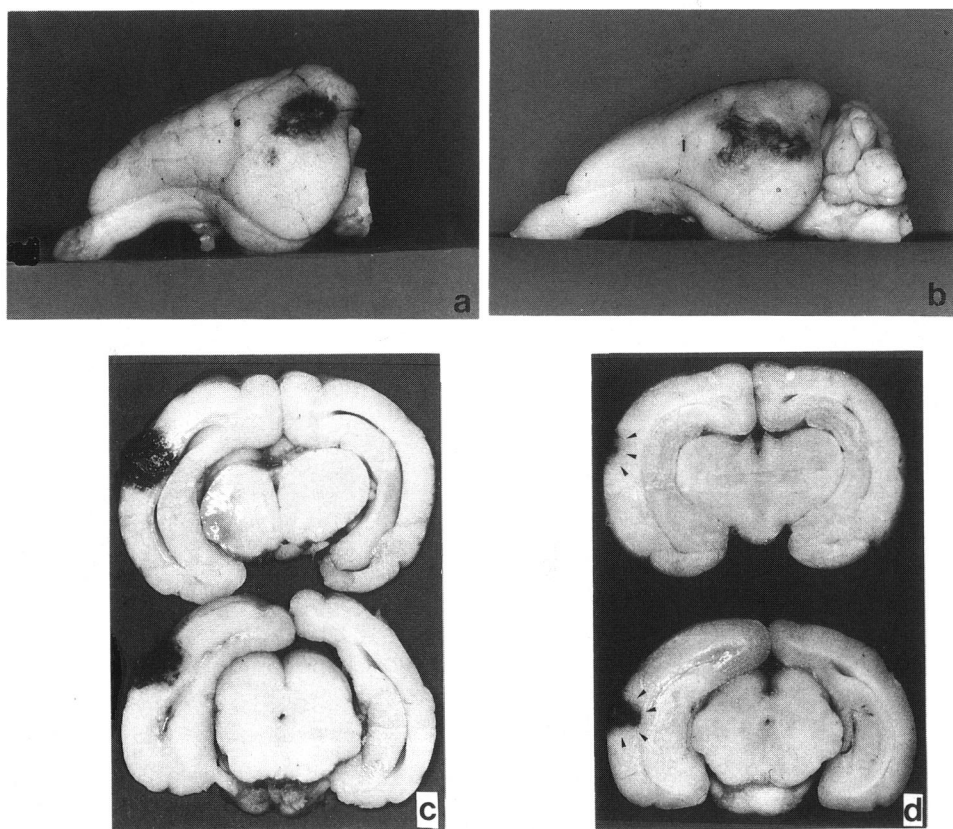


Fig. 1 Hemorrhage and EB leakage seen after obstruction of the cortical vein.

- a Intracerebral hematoma in the cortex opticus seen 24 hours after obstruction of the cortical vein. ($\times 3$) (Case No. 7)
- b Evans blue leakage of the cortex opticus seen 24 hours after obstruction of the cortical vein. ($\times 3$) (Case No. 1)
- c Coronal section of (a) shows a massive hematoma reaching the subcortical white matter. ($\times 5$) (Case No. 7)
- d Coronal section of (b) shows a wedge-shaped area of EB leakage containing small foci of bleedings. ($\times 5$) (Case No. 1)

の染色性の低下を来した部分に血管周囲の出血を認めた。他の2羽ではクモ膜下出血、楔形の脳実質の染色性の低下、空胞形成と血管周囲の出血が認められた。広範囲にEBの漏出が見られた7羽全例は、半円形あるいは楔形の脳実質の染色性の低下、空胞形成、血管周囲の出血が見られ、Fig. 2bのように核の青染凝縮した神経細胞やghost cellなど神経細胞の虚血性壊死の所見も認められた。わずかにEBの漏出が見られた6羽中5羽の組織学的所見はFig. 2cにみられるように、広範囲にEBの漏出が見られた例と同様であった。他の1羽は半円形の脳実質の染色性の低下と軽度の空胞形成を認めた。

静脈閉塞後24時間の群7羽、72時間の群4羽では

血管周囲の出血は、Fig. 3aのように虚血性変化を起こした部分にとどまらず、周囲の組織学的変化の少ない領域にも散在性に認められた。また、24時間の群、72時間の群のそれぞれ8羽に、Fig. 3bのように白質における浮腫が広範囲に進展している所見が認められた。その変化は血腫あるいは梗塞巣の大小に関係なく、閉塞した静脈の還流域を中心として広く見られた。

対照群では、2羽で凝固した皮質の直下に、Fig. 3cのように染色性の低下と空胞形成、神経細胞の凝固壊死などが見られたが、静脈閉塞の場合と比べて軽度であった。光顕的に出血を認めたものが2羽あったが、それらは開頭窓の骨縁で静脈が圧迫され、出血性梗塞を起こしたものと判定された。その他の5羽では、特徴的

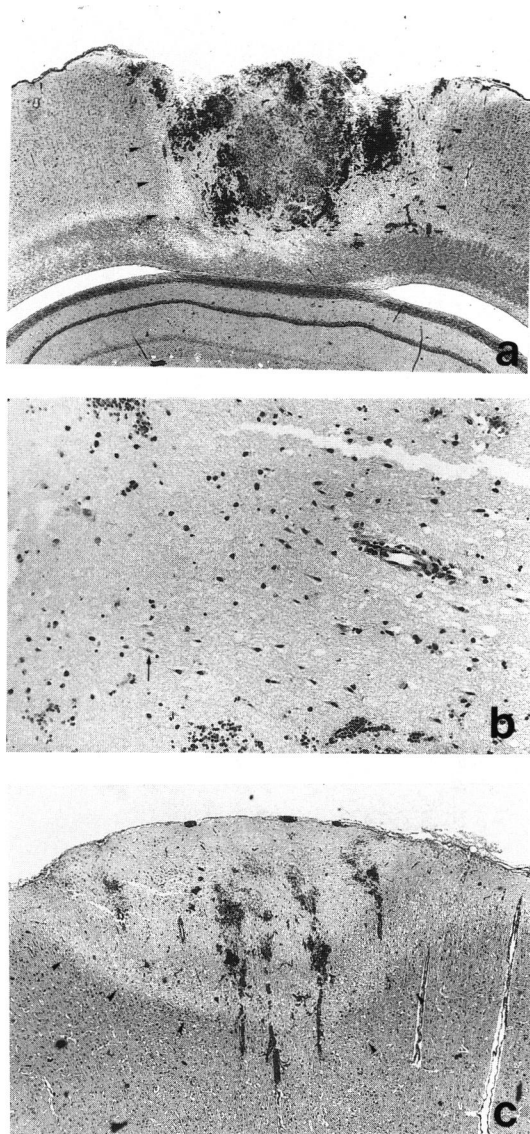


Fig. 2 Microscopic appearance of hemorrhagic infarction after obstruction of the cortical vein.

- a** Multiple petechial hemorrhages seen 24 hours after obstruction of the cortical vein conglomerated into a massive hematoma extending to the layer of the white matter (arrowheads). ($\times 25$) (Case No. 7)
- b** Appearance of ghost cells and condensation of the nuclei were seen as well as petechial hemorrhages in the poorly stained area. Arrow shows a ghost cell. (Case No. 1)
- c** A semicircular area of poor stain seen 72 hours after obstruction of the cortical vein (arrowheads). There were strands of petechial hemorrhages. (Case No. 12)

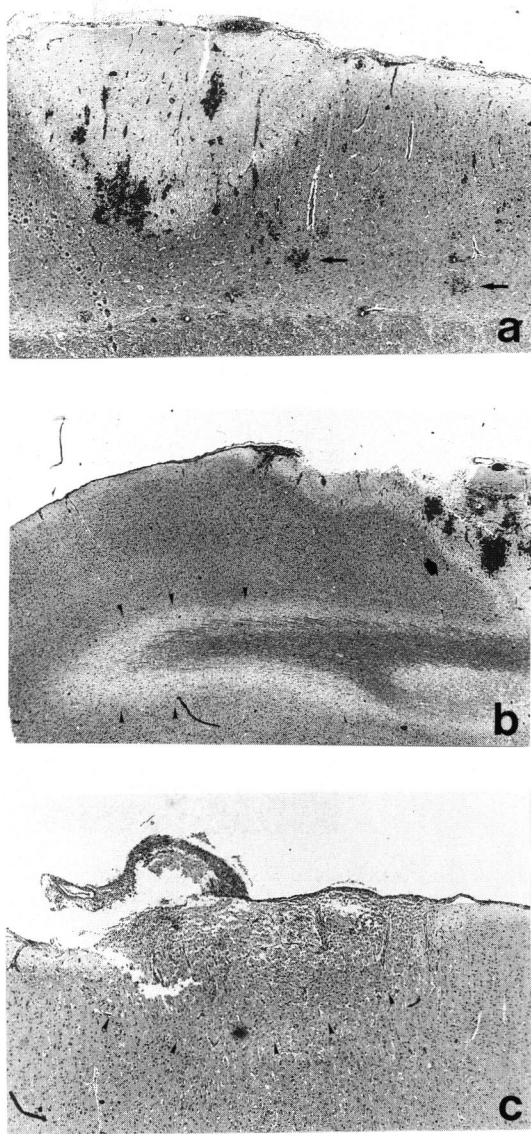


Fig. 3 Histological findings of bleeding and edema after obstruction of the cortical vein and histological findings after cauterization of the cortical surface.

- a** Cerebral infarction after obstruction of the cortical vein containing multiple foci of petechial hemorrhages. Note the distribution of hemorrhagic foci beyond the border of the infarcted area (arrow). ($\times 50$) (Case No. 17)
- b** Cerebral edema extending in the white matter seen 72 hours after obstruction of the cortical vein (arrowheads). ($\times 25$) The big arrow shows the site of hemorrhagic infarction. (Case No. 16)
- c** Typical example of brain damage seen in the control animal following direct cauterization of the cortical surface (arrowheads). ($\times 50$)

な所見は得られなかった。

3・2 脳静脈閉塞時の脳循環変化

全体の実験成績は Table 2 にまとめて示されている。静脈を閉塞したものを 8 羽、対照群として皮質凝固を行なったものを 8 羽、計 16 羽を使用した。

3・2・1 生理的パラメータ

動脈圧、PaCO₂、PaO₂、pH 値および Ht 値はいずれも生理的範囲内にとどまり、各群間で有意差は認められなかった。

3・2・2 rCBF の経時的推移

rCBF は静脈閉塞後 30 分頃より低下し始め、閉塞後 1 時間の値は平均して閉塞前の値（以下「前値」）の 84.9±6.0% (p<0.05)、3 時間の値は前値の 77.9±4.6% (p<0.001) と有意な低下を示した。経過中に rCBF の回復を示したものはなかった。

対照群で、皮質凝固後 1 時間、3 時間の値は皮質凝固前の値とほとんど差を示さなかった。

3・2・3 rCBV, rCBF/rCBV の経時的推移

rCBV は、静脈閉塞後 1 時間で前値の 101.4±1.7%、3 時間で 100.9±1.5%、と大きな変化はなく、対照群でも、ほとんど変化を示さなかった。

rCBF/rCBV は rCBF と同様の変化を示し、静脈閉塞後 1 時間の値は、前値の 83.2±5.0% (p<0.01)、3 時間の値は 77.0±4.5% (p<0.001) と有意の低下を示した。対照群では、ほとんど変化を示さなかった。

3・3 局所脳静脈梗塞への全身血圧上昇の影響

血圧上昇群 10 羽、正常血圧群 10 羽を比較した。

3・3・1 生理的パラメータ

Table 3-a に示されているように、血圧上昇群における動脈圧はメタラミノール投与前、平均 100.0±3.3

Table 2 Changes of hemodynamic variables before and after venous obstruction.

Group	Time	rCBF (%)	rCBV (%)	rCBF/rCBV(%)	MABP (mmHg)	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	Ht (%)
Control (n=8)	before	100	100	100	74.5±3.1	7.33±0.03	120.0±9.5	38.2±0.6	38.8±0.2
	1 hr.	102.6±2.8	102.2±1.0	100.6±2.6	71.6±1.9	7.33±0.02	135.0±14.5	37.4±1.6	
	2 hr.	100.0±1.7	100.5±0.7	99.5±1.5	70.6±2.1	7.35±0.03	140.1±14.5	36.1±1.4	
	3 hr.	101.0±3.4	100.9±0.7	100.1±3.3	69.6±2.0	7.33±0.02	137.8±19.4	36.9±0.9	
venous obstruction (n=8)	before	100	100	100	83.6±3.7	7.35±0.02	133.5±7.9	36.5±1.0	37.6±0.5
	1 hr.	84.9±6.0***	101.4±1.7	83.2±5.0**	79.1±3.0	7.33±0.02	122.1±7.4	35.5±1.6	
	2 hr.	81.4±6.0**	102.0±1.9	79.6±5.3**	77.8±3.3	7.31±0.03	123.4±8.9	36.6±2.1	
	3 hr.	77.9±4.6*	100.9±1.5	77.0±4.5*	78.9±4.0	7.31±0.01	125.7±9.5	37.5±0.6	

MABP: mean arterial blood pressure.

Ht: hematocrit.

*p<0.001, **p<0.01, ***p<0.05 vs pre-obstruction values

Table 3-a Physiological variables of normotensive and hypertensive animals before obstruction of the cortical vein.

Group	MABP (mmHg)	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)
normotensive (n=10)	96.8±5.0	7.39±0.02	109.9±5.1	36.4±0.7
hypertensive (n=10)	130.3±2.3*	7.39±0.02	122.3±6.4	37.1±1.1

MABP : mean arterial blood pressure *p<0.001 vs normotensive

Table 3-b Summary of histopathological changes in normotensive and hypertensive animals after obstruction of the cortical vein.

Group	microscopic hemorrhage	vacuolation and poor stain	area of EB leakage
normotensive (n=10)	0	5	11.1±4.0(mm ²)
hypertensive (n=10)	4	6	32.1±8.6(mm ²)**

**p<0.05 vs normotensive

mmHg で正常血圧群の平均 96.8 ± 5.0 mmHg と比較して有意な差はなかったが、昇圧後は平均 130.3 ± 2.3 mmHg と約 30% 有意に上昇した ($P < 0.001$). PaCO_2 , PaO_2 および pH 値はいずれも生理的範囲内にとどまり、各群間で有意差は見られなかった。

3.3.2 EB 漏出面積

Table 3-b に示されているように、EB 漏出面積は血圧上昇群で 32.1 ± 8.6 mm²、正常血圧群で 11.1 ± 4.0 mm² と血圧上昇群で、有意に大であった ($p < 0.05$).

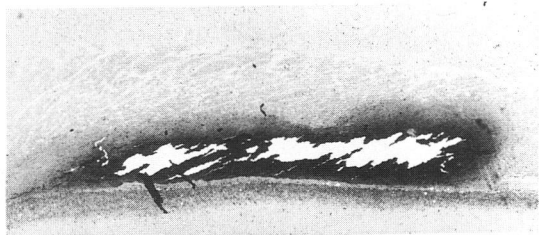


Fig. 4 Massive hematoma in the white matter seen in the animal with induced hypertension following venous obstruction. ($\times 38$)

3.3.3 病理組織学的所見

血圧上昇群、正常血圧群とも脳表面より肉眼的に出血を認めたものはなかった。Table 3-b に示されているように組織学的には、脳実質の染色性の低下、その領域内の空胞形成などの変化を正常血圧群で 5 羽、血圧上昇群で 6 羽に認めたが、いずれも半円形の小さな範囲に限られ、神経細胞の虚血性壊死も顕著ではなかった。出血は正常血圧群では見られず、血圧上昇群で 4 羽に認め、1 羽では Fig. 4 のように白質に大きな出血巣を認めた。

3.4 電顕所見

4 羽を使用して、DAB 反応により発色した、灰白質および白質の病変部について電子顕微鏡による観察を行なった。

発色部では灰白質、白質ともに、毛細血管の周囲に Fig. 5a, b にみられるように無構造な部分が存在し、滲出液によるものと判断した。Fig. 5a のように血管外に赤血球が認められたが、HRP の所在は明らかではなかった。また毛細血管の中には、Fig. 5c, d にみられるよう

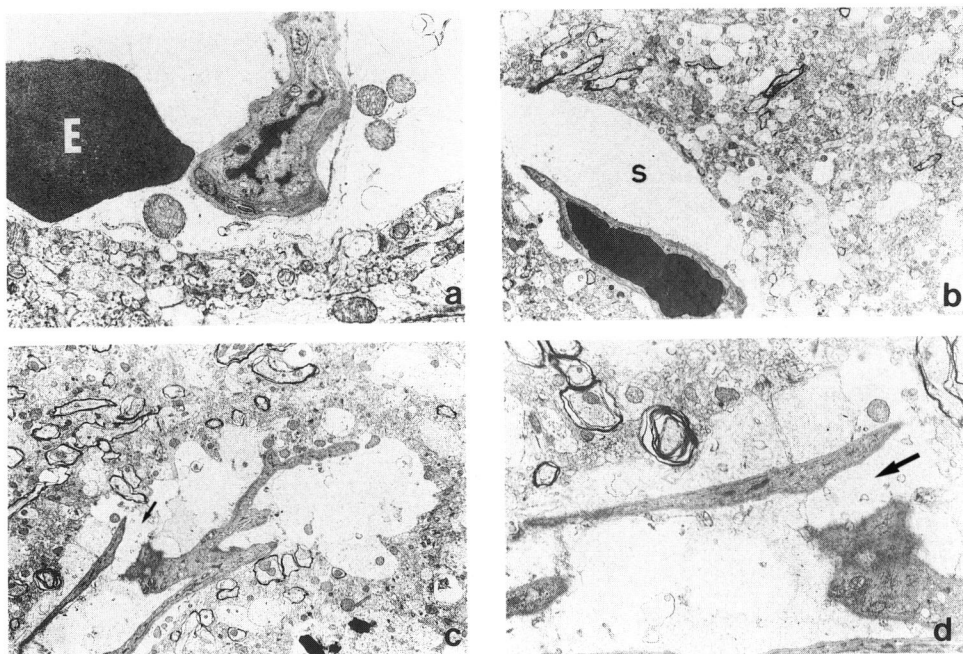


Fig. 5 Electron microscopic findings of the cortex 60 minutes after obstruction of the cortical vein. HRP was injected 15 minutes before the sacrifice.

- The space around the capillary is enlarged markedly. There is an extravasated erythrocyte in the perivascular space. HRP is seen in the capillary. ($\times 16600$) E: erythrocyte
- The space around the capillary is distended. ($\times 4800$) S: space around the capillary.
- Damaged vessel wall of the capillary with enlarged space around the capillary was noted. ($\times 4000$) Arrow shows the destroyed capillary.
- Higher magnification at the site of damaged vessel wall of the capillary. ($\times 10000$)

に血管壁の破壊を認めるものがあり、静脈圧の亢進による結果と思われた。

3・5 静脈走行の個体差と静脈梗塞発生率

3・1において使用した動物のうち、静脈閉塞例 20 羽について、皮質静脈の走行の個体差と静脈梗塞の発生率について検討した。

Cortex opticus を還流する静脈は Fig. 6 のように 3 型に分類され、ventrolateral vein の 1 本の分枝であるもの 8 羽 (40%)、ventrolateral vein の 2 本の分枝であるもの 6 羽 (30%)、橋静脈の分枝と ventrolateral vein の分枝であるもの 6 羽 (30%) であった。EB 漏出面積が 10 mm² 以上であったものの発生率は

ventrolateral vein の 1 本の分枝であるものの 7/8 羽 (88%)、ventrolateral vein の 2 本の分枝であるものの 3/6 羽 (50%)、橋静脈の分枝と ventrolateral vein の分枝であるものの 4/6 羽 (67%) であった。

4 考 察

4・1 局所脳静脈梗塞モデルの作製について

脳静脈梗塞の動物実験モデルの作製は上矢状洞のクリッピング、熱凝固、異物の挿入¹⁻⁹⁾、上大静脈の絞扼⁷⁾、頸静脈からの血液注入⁸⁾、上、下大静脈に静水圧をかけて脳静脈圧を上昇させる方法⁹⁾、心房内にバルーンを挿入する方法¹⁰⁾、静脈洞交会にバイパスを作り圧を上昇させる方法¹¹⁾、外頸静脈より凝血塊を注入する方法¹²⁾など様々な方法で試みられてきたが、後述の一報告¹³⁾を除いて、すべてが静脈洞あるいは頸静脈を処置する方法である。これらの方法は、頭蓋内圧亢進を伴うため、静脈還流障害と頭蓋内圧亢進という 2 つの病態を反映するモデルとなってしまう。一方局所的に静脈梗塞を作製するには、静脈の走行に個体差が大きく、また側副血行路の存在のため再現性が低いという問題があり、サルのような高価で入手が困難な動物を使用することは、たとえ静脈系の構築がヒトにもっとも近いと言えども現実的ではない。またイヌ、ネコ、ラットなどの動物では、静脈の側副血行路がさらに豊富に発達しているため、適当ではないと考えられている。

家兎の静脈系は ventrolateral vein, ventromedial vein, 上矢状洞の大きな 3 本の静脈とそれに注ぐ分枝からなっており、他の小動物と比べて側副血行路の発達に乏しい^{15,16)}。本研究では、この点に着目し、家兎を用いた局所静脈梗塞を生じる実験モデルの作製を試みた。その後の文献検索により、1989 年、Secrist *et al.*¹³⁾が、同じくウサギの橋静脈を結紮し傍矢状部の皮質に静脈梗塞を作り、経時的な MRI 所見を報告していることが明らかとなった。しかし、この報告は、MRI 画像上の特徴を知ることを目的としたもので、詳細な病理組織学的検討は行なわれておらず、例数も 5 例で少ない。また、ウサギの前頭部は白質が小さく、彼らが作製したような前頭部の傍矢状部静脈梗塞では白質への影響ははっきりと捕らえられないと考えられる。

本研究では、cortex opticus, cortex acusticus を含む脳の背外側面の広い範囲が 1, 2 本の皮質静脈により還流されているのに着目し、この部位の静脈の熱凝固を行なったところ、70% の動物に広い範囲の静脈梗塞が発生した。

静脈を双極電気凝固摂子で熱凝固する場合、Chehr-

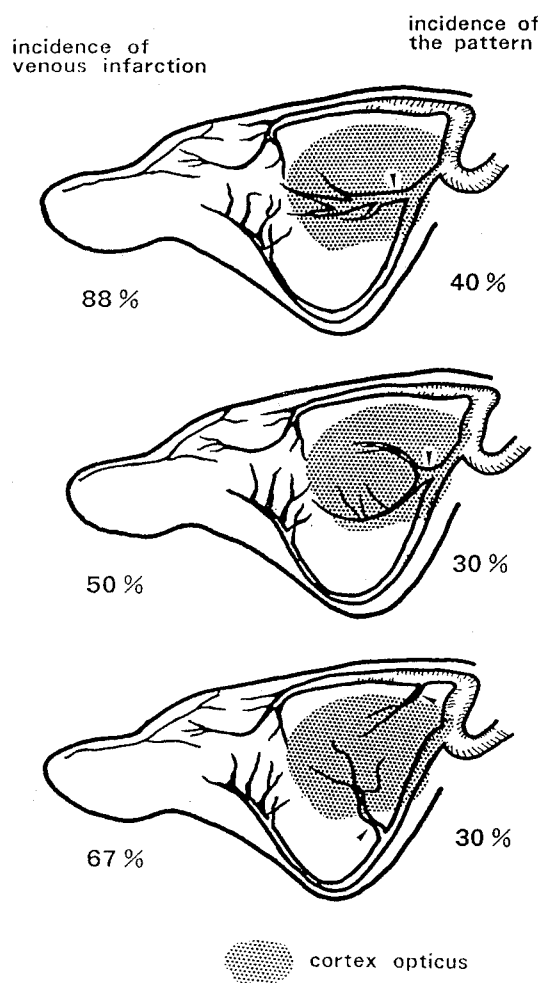


Fig. 6 Typical pattern of the cortical vein on the cortex opticus and the incidence of venous infarction when the obstruction was performed. Arrowheads indicate the site of venous obstruction.

azi and Collins¹⁷⁾が記載しているように熱による組織への影響が問題となる。本研究では熱凝固による脳損傷を避けるために、術野に生理的食塩水を滴下しながら、先端0.3 mmの双極電気凝固摂子を用いて約4 wattにて静脈を選択的に熱凝固した。熱凝固の影響としては、対照群において組織学的には脳実質の染色性の低下と空胞形成、神経細胞の凝固壊死が、熱凝固した部分の周囲1 mm程度に認められたが、変化は限局性で程度も軽かった。一方、静脈閉塞例では虚血性の変化が強く、また、ほとんどの例で出血が見られ、しかも出血は虚血性変化が明らかな部分の外側にも生じており、熱凝固による組織変化とは明らかに異なる所見を呈していた。

これらの結果から、本研究で作製したモデルは、再現性を持つ局所的脳静脈梗塞を作り得た初めてのモデルであると考ええる。

4・2 脳静脈梗塞の病態について

4・2・1 病理組織学的所見

4・2・1・1 脳静脈梗塞の虚血性変化と出血

従来より、脳静脈梗塞の病態に関する検討は脳静脈洞血栓症の臨床例において行なわれ¹⁸⁾、病理学的には、強い浮腫を伴う出血性梗塞として理解されている。しかし、虚血や出血の程度や範囲、浮腫の成因や時間的経過など、詳細はほとんど知られておらず、また、動脈梗塞の再開通に伴う出血性梗塞との違いについても不明である。

本研究における静脈梗塞では、皮質に半円形あるいは楔形の境界鮮明な虚血性変化を伴う場合がほとんどであった。この形態は血管支配に一致し、一本の静脈の支配領域に一樣な虚血が起こっていると推測させる所見であり、Ojeda *et al.*¹⁹⁾が、産褥期に発症した上矢状洞血栓症で報告している、正常部との境界が鮮明な虚血性変化と対応する。

出血は、静脈梗塞における特徴的な変化として知られているが、過去の上矢状洞閉塞による静脈圧亢進モデルでは、クモ膜下出血、脳室内出血が報告され、皮質下出血は必ずしも認められていない¹²⁾。Sato *et al.*^{3,5)}はイヌの上矢状洞閉塞モデルを用いた実験で同様な観察を行ない、周囲に支持組織を持たない軟膜静脈は圧の亢進に最も弱いと推論している。これに対して、皮質静脈を閉塞した本研究の例ではクモ膜下出血を認めた全例に皮質下出血を認め、臨床例における皮質静脈閉塞の像に近い。この違いは、血栓が静脈洞内のみならず皮質静脈にまで及ぶと、脳内出血を生じることが多いという臨床例における観察^{20,21)}と対応しており、静

脈洞の閉塞と皮質静脈の直接的な閉塞との病像の違いを、実験モデルにおいても示しているものとして興味深い。

本研究における出血は、最初は血管を中心として点状に生じ、静脈閉塞後24時間の群より72時間の群に高頻度に観察されたように時間の経過と共に、次第に融合して大きな血腫を形成していた。静脈閉塞における血管の破綻が一次的な静脈圧の亢進によって起こるのか、虚血により血管壁の壊死が生ずることによるのかについては未だ不明である。藤田⁴⁾、Denny-Brown *et al.*²²⁾は血管壁が虚血により障害を受けやすいことを指摘しているが、一方内皮細胞は虚血に対して抵抗性を持つという報告もある²³⁾。本研究では、血管周囲の点状出血が、組織学的に虚血性変化が認められない領域にも多数存在した。この所見は、静脈梗塞における血管の破綻が血管内圧の上昇によるものであることを示唆している。

血管内圧の亢進に対する静脈系の耐性に関しては、ほとんど知られていない。Ueda *et al.*²⁴⁾はラットにおいて中大脳動脈閉塞後、下大脳静脈より自家血を注入し各注入圧における血管透過性の変化から、静脈の耐性を検討しているが、本研究では彼らの実験とは異なり動脈は開存しており、また後述のように、動脈圧の上昇が血管透過性の亢進に明らかな影響を及ぼすことから同一に論ずることはできないと思われる。

4・2・1・2 静脈梗塞における脳腫脹

静脈梗塞において強い脳浮腫が生じる理由としては、血管床の拡張と静脈への浮腫液の吸収の障害が考えられる。本研究における光顕所見では虚血性神経細胞壊死が見られる領域に一致して、星状膠細胞の膨化が起こっていると考えられた。さらに特徴的な所見として、虚血領域の大小にかかわらず、閉塞した静脈の直下から広い範囲の白質に強い空胞形成が認められた。この所見は、静脈還流障害の影響が白質静脈にまで及んでいることを示すと考えられる。

電子顕微鏡による観察において、灰白質、白質共に毛細血管の周囲に広がる無構造な部分が見られ、毛細血管にまで及ぶ血管透過性の亢進が起こったと考えられた。vesicleの増加、tight junctionの開大は確認されなかったが、水の漏出は、細胞膜からの拡散あるいはtight junctionを通して行なわれ得ると考えられ、また、一部の毛細血管の破壊が見られたことから、分子の大きなものは血管の破綻の結果、漏出していると推定された。HRPの所在がはっきりと確認できなかったのは、HRPが破綻した血管から血管外に拡散してし

まったためと考えられた。

これらの所見から静脈梗塞では動脈梗塞と異なり、毛細血管にまで及ぶ血管内圧の亢進が正常の水の移動を障害し、浮腫液の吸収も制限するであろうと思われる。

4・2・2 脳循環より見た脳静脈梗塞

レーザー組織血流計は組織血流量を連続的に測定できる方法として有用であるが、絶対値には信頼性が確立されていない。したがって血流変化の方向と時間的経過についてのみ検討することが妥当であると言われている²⁵⁾。本研究では、静脈閉塞後 30 分頃より血流が低下し始め、3 時間後には前値の 78% 程度となった。動脈閉塞と異なるこのゆっくりとした血流低下は、静脈梗塞の特徴と考えられたが、このような知見は全く未知の分野であり、今後の検討課題であろう。

血液量に関しては、rCBF/rCBV は低下し、血管拡張が起こっていることが推測されたが、rCBV の増加は明らかではなかった。この結果については次のような要因が考えられる。レーザー組織血流計は 30~30000 Hz の帯域内で、組織内赤血球の反射光の強度と周波数変化を基に血液量と血流量を計算している²⁶⁾。しかし、静脈の閉塞により赤血球の速度が異常に遅くなった場合には、この帯域外となってしまう血液量として捕らえられなくなる可能性が考えられる。また、この方法では測定範囲がプローベの先端を中心に半径 1 mm の半球状と小さく、かつ血液量は正常でも大きく変化するため血管床の増大を有意に捕らえられなかった可能性も考えられた。

4・2・3 静脈梗塞における全身血圧上昇の影響

静脈梗塞に対して血圧の上昇がどのような影響を与えるかは、臨床例における管理という点で重要な課題であるが、今まで全く知見がない。本研究では、血圧の上昇は、平均血圧の 30% 程度であったが、血圧上昇群では出血、血管透過性の亢進が著明に見られ、1 例では白質に強い出血を生じた例が見られた。これらの所見は明らかに血管内圧の上昇の結果と考えられるが、静脈閉塞状態で動脈圧の上昇がどのレベルの血管床にまで影響を及ぼすかは知られておらず、今後の課題と考えられる。

5 要 約

家兎を用いて、局所脳静脈梗塞の動物実験モデルを作製し、その病態について検討した。

1) 家兎の cortex opticus を還流する皮質静脈を熱凝固することにより、70% 以上の確率で局所脳静脈梗

塞を作製することができた。

2) 静脈梗塞巣は静脈還流域に一致し、脳表面を底部とする半球状の境界明瞭な脳虚血性変化を示す領域であり、多数の点状出血を含んでいた。この点状出血は虚血性変化を起こしている病巣の外側部にも見られ、出血の要因が血管内圧の上昇による血管の破綻であることが明らかとなった。時間の経過と共にこれらは融合し、大きな血腫を形成した。

3) 電子顕微鏡による観察から、血管の破綻と毛細血管にまで及ぶ血管透過性の亢進が認められた。

4) vesicle transport の亢進は見られず、浮腫の発生には、水の移動と直接的な血管破綻が重要であると思われた。

5) 白質に強く浮腫液の広がりが見られ、静脈圧の亢進は白質にまでおよび、静脈梗塞に特徴的な強い脳腫脹の要因になると思われた。

6) 脳血流量は、静脈閉塞後 30 分頃より徐々に低下し、3 時間後には静脈閉塞前の値の約 22% の低下を示した。

7) 全身血圧の上昇により血管透過性の亢進、出血性変化は増悪し、血圧の上昇は静脈梗塞の病態悪化につながると思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲頂いた端 和夫教授ならびに病理組織学的御教示を頂いた病理学第 2 講座水無瀬 昂助教授に深謝致します。また、研究に際し御助言、御協力頂いた上出廷治先生、岡田 忠氏および教室諸兄に感謝の意を表します。

文 献

1. Beck, D. J. K. and Russell, D. S.: Experiments on thrombosis of the superior longitudinal sinus. *J. Neurosurg.* 3, 337-347 (1946).
2. Owens, G., Stahlman, G., Capps, J. and Meierowsky, A. M.: Experimental occlusion of dural sinuses. *J. Neurosurg.* 14, 640-647 (1957).
3. Sato, S., Miyahara, Y., Dohmoto, Y., Kawase, T. and Toya, S.: Cerebral microcirculation in experimental sagittal sinus occlusion in dogs, In: Auer, L. M. and Loew, F.: *The Cerebral Veins, An Experimental and Clinical Update.* 111-117, Springer-Verlag, Wien (1983).
4. 藤田勝二, 児島範明, 松本 悟: 脳静脈洞閉塞による静脈性出血性梗塞モデル. *脳神経外科* 12, 1061-1067 (1984).

5. Sato, S., Toya, S., Ohtani, M. and Kawase, T.: The effect of sagittal sinus occlusion on blood-brain barrier permeability and cerebral blood flow in the dog, In: Inaba, Y., Klatzo, I. and Spatz, M.: Brain edema. 235-239, Springer-Verlag, Berlin (1985).
6. Sarwar, M., Virapongse, C. and Carbo, P.: Experimental production of superior sagittal sinus thrombosis in the dog. **AJNR** **6**, 19-22 (1985).
7. Jacobson, I., Harper, A. M. and McDowall, D. G.: Relationship between venous pressure and cortical blood flow. **Nature** **200**, 173-175 (1963).
8. Raisis, J. E., Kindt, G. W., McGillicuddy, J. E. and Giannotta, S. L.: The effects of primary elevation of cerebral venous pressure on cerebral hemodynamics and intracranial pressure. **J. Surg. Res.** **26**, 101-107 (1979).
9. Wagner, E. M. and Traystman, R. J.: Effects of cerebral venous and cerebrospinal fluid pressure on cerebral blood flow, In: Auer, L. M. and Loew, F.: The Cerebral Veins, An Experimental and Clinical Update. 223-230, Springer-Verlag, Wien (1983).
10. Ekström-Jodal, B.: Effect of increased venous pressure on cerebral blood flow in dogs. **Acta Physiol. Scand.** **80** (Suppl. 350), 51-61 (1970).
11. Emerson, T. E., Jr. and Parker, J. L.: Effect of local increases of venous pressure on canine cerebral hemodynamics, In: Langfitt, T. W., MacHenry, L. C., Jr., Reivich, M. and Wollman, H.: Cerebral Circulation and Metabolism. 10-13, Springer-Verlag, New York (1975).
12. 黒川泰任: ラットにおける一次的脳静脈圧上昇モデルの作製と脳組織障害の局所的検討. **札幌医誌** **56**, 171-185 (1987).
13. Secrist, R. D., Traynelis, V. and Schochet, S. S., Jr.: MR imaging of acute cortical venous infarction: Preliminary experience with an animal model. **Magn. Reson. Imaging** **7**, 149-153 (1989).
14. Karnovsky, M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy (abst.). **J. Cell Biol.** **27**, 137A (1965).
15. Scremin, O. U., Sonnenschein, R. R. and Rubinstein, E. H.: Cerebrovascular anatomy and blood flow measurements in the rabbit. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** **2**, 55-66 (1982).
16. Jeppsson, P. G. and Olin, T.: Cerebral angiography in the rabbit. **Acta Univ. Lund. N. F. Avd.** **2**, 56, 1-55 (1960).
17. Chehraz, B. and Collins, W. F., Jr.: A comparison of effects of bipolar and monopolar electrocoagulation in brain. **J. Neurosurg.** **54**, 197-203 (1981).
18. Bousser, M. G., Chiras, J., Bories, J. and Castaigne, P.: Cerebral venous thrombosis-A review of 38 cases. **Stroke** **16**, 199-213 (1985).
19. Ojeda, V. J., Hilton, J. M. N. and Stewart-Wynne, E. G.: Puerperal superior sagittal sinus thrombosis. **Med. J. Aust.** **2**, 584-585 (1982).
20. Kalbag, R. M. and Woolf, A. L.: Thrombosis and thrombophlebitis of cerebral veins and dural sinuses, In: Vinken, P. J. and Bruym, G. M.: Handbook of Clinical Neurology. 12, 434, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1972).
21. 関 博文, 園部 真, 樋口 弘: 上矢状静脈洞および右横静脈洞血栓症による出血性梗塞の一例とそのCT像. **神経外科** **19**, 537-541 (1979).
22. Denny-Brown, D., Horestein, S. and Fang, H. C. H.: Cerebral infarction produced by venous distention. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** **15**, 146-180 (1956).
23. 室田誠逸: 虚血実験系. 室田誠逸編集, 血管細胞の培養法とその応用, **現代化学 増刊** **16**, 194-196, 東京化学同人, 東京 (1989).
24. Ueda, T., Yamamoto, Y. L., Takara, E. and Diksic, M.: Tolerance of the cerebral venous system to retrograde perfusion pressure in focal cerebral ischemia in rats. **Stroke** **20**, 378-385 (1989).
25. Dirnagl, U., Kaplan, B., Jacewicz, M. and Pulsinelli, W.: Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-doppler flowmetry in a rat stroke model. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** **9**, 589-596 (1989).
26. Bonner, R. F., Clem, T. R., Bowen, P. D. and Bowman, R. L.: Laser-doppler continuous real-time monitor of pulsatile and mean blood flow in tissue microcirculation, In: Chen, S. H., Chu, B. and Nossal, R.: Volume 3 of NATO ASI Series B. 685-701, Plenum, New York (1981).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学脳神経外科学講座 藤重正人